

## Muse細胞における幹細胞活性を調節するHIF-let-7システムに関する研究

著者	李 根
号	89
学位授与機関	Tohoku University
学位授与番号	医博第4075号
URL	<a href="http://hdl.handle.net/10097/00129534">http://hdl.handle.net/10097/00129534</a>

氏 名	り こん 李 根
学 位 の 種 類	博士 (医学)
学位授与年月日	2020 年 3 月 25 日
学位授与の条件	学位規則第 4 条第 1 項
研 究 科 専 攻	東北大学大学院医学系研究科 (博士課程) 医科学専攻
学 位 論 文 題 目	Muse細胞における幹細胞活性を調節する HIF-let-7 システムに関する研究
論 文 審 査 委 員	主査 教授 出澤 真理 教授 谷内 一彦 教授 細井 義夫

## 論 文 内 容 要 旨

Muse細胞(Multi-lineage differentiating Stress Enduring cell)は骨髄や各臓器の結合組織に存在し、末梢血や損傷した臓器に移動できる生体内の多能性幹細胞である。胚性幹細胞や iPS 細胞のようにさまざまな細胞への分化能力を持っている一方、生体由来であるので腫瘍性がない。Lin28-let-7 システムは ES 細胞や iPS 細胞などの幹細胞やがん細胞の増殖・幹細胞性や代謝において重要な役割を果たしていることが知られている。Lin28 は RNA 結合タンパクで ES/iPS 細胞やがん細胞で高発現し、細胞増殖に向かう因子を活性化する一方、Let-7 にも結合し活性を抑制する。let-7 は microRNA で mRNA に結合することで発現を抑制するもので、分化細胞で高発現し幹細胞やがん細胞では低発現する。Let-7 は Lin28 の mRNA に結合し silencing を行う。従って let-7 と Lin28 は相互に抑制し合う mutual antagonistic な関係である。Muse 細胞は ES/iPS 細胞と同じく多能性であるが、興味深いことに高レベルの let-7 を発現するものの Lin28 は発現しない。我々は Lin28-let7 に代わる新しい細胞活性調整システム、mutual co-operative な Hypoxia inducible factor (HIF)-Let 7 系を見いだした。Muse 細胞の代謝は iPS 細胞に近似した形で iPS 細胞と分化細胞との間にある。低酸素培養あるいは HIF を安定的に発現させる CoCl<sub>2</sub> 存在下では、Muse 細胞の代謝は解糖系から酸化的リン酸化にシフトし、増殖速度は遅くなった。さらに、通常酸素条件に比べ、低酸素培養および CoCl<sub>2</sub> 添加後 let-7 の発現も上昇した。通常酸素状態での let-7 のノックダウンは、Muse 細胞の解糖系と酸化的リン酸化両方を上向き調節し、細胞に増殖をより加速させた。また、let-7 のノックダウンは、多能性因子 Oct4、Sox2、Nanog、Klf4 および Tbx3 の発現を下向き調節させた。パイオインフォマティクスの分析より、細胞周期と DNA 複製に関する因子は let-7 ノックダウンによって促進させられることが分かった。さらに HIF-1 $\alpha$  を siRNA で抑制すると、通常酸素状態下の CoCl<sub>2</sub> の効果を無効化したことも見られた。これらの結果より、HIF-let-7 システムが新たな協同システムとして成体幹細胞の代謝、増殖および幹細胞性を調節する可能性が考えられる。

## 審 査 結 果 の 要 旨

博士論文題目 ..... Muse 細胞における幹細胞活性を調節する HIF-let-7 システムに関する研究.....

所属専攻・分野名 ..... 医科学 専攻 ..... 細胞組織学 分野.....

学籍番号 ..... B 6 M D 5 1 3 6 ..... 氏名 ..... 李 根.....

幹細胞の未分化や分化を決定する重要な要因として細胞内の代謝バランスが知られている。細胞内代謝は解糖系とミトコンドリアに依存する酸化的リン酸化の二つのバランスで制御されているが、未分化性を有する細胞、たとえば ES 細胞、iPS 細胞やガン細胞では解糖系が優位であり、一方、分化した細胞は酸化的リン酸化が優位であることが知られている。この代謝バランスを調節する基軸として Lin28-let-7 系が知られている。Lin28 は RNA 結合タンパクで胚性幹細胞・iPS 細胞および一部のガン細胞で高発現し、細胞増殖や代謝に向かう因子を活性化する一方、let-7 の生合成を抑制する。let-7 は microRNA で mRNA に結合することでタンパク質の翻訳を抑制する。Let-7 は分化細胞で高発現し、一部の幹細胞やガン細胞では低発現し、Lin28 mRNA の翻訳を抑制する。したがって let-7 と Lin28 は相互に抑制し合う mutual antagonistic な関係である。ES, iPS、ガン細胞では Lin28 の活性が高く、一方分化細胞では Let-7 が優位になる。

Muse 細胞 (Multi-lineage differentiating stress enduring cell) は骨髄や各臓器の結合組織に存在し、末梢血や損傷した臓器に移動できる生体内の多能性幹細胞である。胚性幹細胞や iPS 細胞のようにさまざまな細胞への分化能力を持っている一方、生体由来であるので腫瘍性がない。この特異な性質を代謝という切り口から Muse 細胞を解析したところ、高レベルの let-7 を発現するものの Lin28 は発現しないことがわかった。さらに Lin28-let7 に代わる新しい細胞活性調整システム、mutual co-operative な Hypoxia-inducible factor (HIF)-let 7 系を見いだした。低酸素あるいは  $\text{CoCl}_2$  低酸素擬似培養は HIF を安定的に発現させるが、この際に、Muse 細胞の代謝はさらに解糖系へシフトし、増殖速度も遅くなった。多能性因子 Oct4、Sox2、Nanog、Klf4 および Tbx3 の発現も増加し、Muse 細胞は高い幹細胞性を維持する。さらに、通常酸素条件に比べ、低酸素培養および  $\text{CoCl}_2$  添加後 let-7 の発現も上昇した。通常酸素状態での let-7 のノックダウンは、Muse 細胞の解糖系と酸化的リン酸化両方を上向き調節し、細胞の増殖をより加速させた。また、let-7 のノックダウンは、多能性因子 Oct4、Sox2、Nanog、Klf4 および Tbx3 の発現を下向き調節させた。したがって、let-7 は HIF と同じく、多能性の促進および増殖の抑制の役割があり、低酸素条件下において HIF の効果を強める。これらの結果より、HIF-let-7 システムが新たな協同システムとして成体幹細胞の代謝、増殖および幹細胞性を調節する可能性が考えられる。

よって、本論文は博士（医学）の学位論文として合格と認める。